

Angka Konsepsi Hasil Inseminasi Semen Cair Versus Semen Beku pada Kuda yang Disinkronisasi Estrus dan Ovulasi

Pregnancy Rate Following Insemination with Fresh versus Frozen Semen after Estrus and Ovulation Synchronization in Mare

R. I. Arifiantini *, B. Purwantara, T. L. Yusuf, D. Sajuthi, & Amrozi

Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
(Diterima 16-02-2009; disetujui 27-10-2009)

ABSTRACT

Semen used for artificial insemination (AI) can be prepared in different ways, fresh extended fresh or chilled, or frozen-thawed (FT). The aim of the experiment was to evaluate the use of preserved semen to inseminate the oestrus mares. Nineteen mares were used in this research. The mares were synchronized with double injection of $\text{PGF}_2\alpha$ 14 days apart. The follicle size was monitored using ultrasound scanner during the third day of oestrus, and 2500 IU hCG was administered at the same time. The AI was conducted 35 hours after hCG injection with total motile sperm 200×10^6 for chilled semen and $250-300 \times 10^6$ for frozen semen. The result demonstrated that the response of the oestrus with double injection of $\text{PGF}_2\alpha$ was 73.7%. The conception rate (CR) was 14.3% (1/7) with frozen semen and 42.9% (3/7) with chilled semen. It is concluded that AI with chilled semen resulted higher conception rate than frozen semen.

Key words: mare, synchronization, oestrus, ovulation, artificial insemination dose, conception rate

PENDAHULUAN

Inseminasi buatan (IB) pada dekade terakhir ini sudah menjadi teknologi utama dalam perkembangbiakan kuda *warmblood* dan *standardbred* pada industri pembibitan di Jerman, Perancis, Belanda, Belgia, Denmark, dan Swedia. Seratus delapan puluh sentra IB terdaftar di Jerman pada tahun 1999 dan 60 diantaranya mendapat izin pemerintah di Eropa untuk pengadaan semen beku kuda (Sieme *et al.*, 2000).

Inseminasi buatan pada kuda telah dilaksanakan sejak tahun 2000-an di Indonesia, tepatnya di Yogyakarta dengan menggunakan semen cair. Angka konsepsi yang dicapai cukup tinggi, yaitu 40%-50%. Pelaksanaan IB dimulai pada hari keempat estrus dan dilakukan selama tiga hari berturut-turut sampai gejala estrus hilang. Pelaksanaan IB menggunakan semen beku juga dilakukan pada tahun 2000-an di Jakarta, tetapi hanya terbatas pada *stable* tertentu, dan semen beku yang digunakan masih impor dengan harga yang sangat mahal.

Keberhasilan IB pada ternak kuda sampai saat ini belum menunjukkan hasil yang optimal, dibandingkan dengan ternak lainnya. Beberapa penghambat keberhasilan IB pada kuda adalah lamanya waktu estrus dan bervariasinya waktu ovulasi. Ovulasi pada ternak kuda secara alamiah terjadi menjelang akhir estrus tepatnya antara 48 dan 24 jam sebelum akhir estrus (Squires, 2004). Oleh karena itu IB pada kuda terutama jika menggunakan semen beku memerlukan ketepatan waktu antara inseminasi semen ke dalam saluran reproduksi dengan waktu ovulasi. Waktu ovulasi pada kuda dapat lebih mudah ditentukan dengan sinkronisasi estrus dan ovulasi. Menurut Samper (2001), ovulasi pada kuda biasanya terjadi antara 24 dan 36 jam setelah penyuntikan *human chorionic gonadotrophin* (hCG).

Semen kuda lebih mudah rusak dibandingkan dengan semen ternak yang lain dan kemampuan bertahan terhadap proses pendinginan dan pembekuan yang rendah. Spermatozoa kuda yang tahan dibekukan hanya sekitar 24% dan 30% (Linfor *et al.*, 2002) sampai 33% (Vidament *et al.*, 2002) dengan *post thawing motility* (PTM) berkisar antara 28,5% sampai dengan 36,2% (Arifiantini *et al.*, 2007). Semen cair kuda juga dalam waktu 24 jam akan menurun kualitasnya secara drastis (Arifiantini *et al.*, 2006).

Preparat prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) dikenal sebagai agen luteolitik yang dapat menyamakan siklus estrus dalam waktu yang bersamaan, sedangkan hCG dapat

*Korespondensi:

Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
Tlp. 0251-8629461, faks. 0251-8629459.
e-mail: iis.arifiantinipurna@gmail.com

menginduksi ovulasi, sehingga pemberian hCG pada pertengahan estrus dapat merangsang pelepasan ovum dalam waktu yang lebih seragam. Dengan demikian perkembangan folikel dapat diamati sehingga dapat ditentukan waktu inseminasi yang lebih tepat. Penelitian ini dilakukan untuk menguji angka konsepsi pada kuda yang diinseminasi menggunakan semen cair dan semen beku setelah dilakukan sinkronisasi estrus dan ovulasi.

MATERI DAN METODE

Hewan Percobaan

Sebanyak 19 ekor kuda betina digunakan sebagai akseptor IB yang berasal dari generasi dua (G2) dan tiga (G3) hasil silang kuda thoroughbred dengan kuda sumba, berumur antara 4 hingga 23 tahun. Kuda betina yang digunakan untuk uji fertilitas diseleksi berdasarkan kesehatan reproduksi, tidak mengalami gangguan saluran reproduksi, tidak sedang bunting dan paling cepat tiga bulan *postpartum*. Kuda-kuda tersebut mempunyai aktivitas ovarium dan kondisi uterus yang normal hasil seleksi menggunakan ultrasonografi (USG). Kuda yang digunakan seluruhnya milik Kavaleri Angkatan Darat, Parongpong-Lembang, Bandung. Kuda-kuda tersebut dikandangan secara individual diberi pakan berupa konsentrat 7 kg, ditambah rumput dan jerami yang telah dilayukan masing-masing 10 kg ekor⁻¹ hari⁻¹, air minum diberikan *ad libitum*.

Sinkronisasi Estrus dan Inseminasi

Sembilan belas ekor kuda betina yang tidak bunting tanpa dilakukan observasi ovarium diberikan prostaglandin PGF₂α (Prosolvin® Intervet International, Holland) sebanyak 7,5 mg diberikan secara intramuskuler (i.m.) sebanyak dua kali dengan selang waktu 14 hari. Deteksi berahi dilakukan menggunakan jantan pengusik, mulai hari pertama sampai hari ke lima setelah PGF₂α yang kedua. Kuda-kuda betina yang menunjukkan respon estrus dipisahkan dan diamati secara intensif. Observasi folikel ovarium dilakukan pada hari ketiga estrus menggunakan ultrasonografi (USG) (Aloka 500). Perkembangan dan ukuran folikel dicatat. Penyuntikan hCG (Chorulon® Intervet International, Holland) sebanyak 2500 IU i.m. dilakukan pada waktu yang sama (Nie *et al.*, 2002). Perkembangan dan ukuran folikel diamati 35 jam setelah penyuntikan hCG, dan dicatat.

Kuda-kuda betina yang berhasil estrus diacak dan dibagi dua kelompok, masing-masing 7 ekor. Kelompok pertama diinseminasi menggunakan semen cair dengan dosis inseminasi 200x10⁶ total normal spermatozoa yang motil (TNSM). Kelompok kedua diinseminasi menggunakan semen beku dengan dosis inseminasi 250 dan 300x10⁶ TNSM. Volume IB pada kuda ditentukan oleh kualitas semen cair atau semen beku yang digunakan. Semen yang digunakan, baik semen cair, ataupun semen beku berasal dari pejantan dan *batch* produksi yang sama. Inseminasi dilakukan 36 jam setelah penyuntikan hCG, menggunakan kateter plastik khusus untuk IB kuda.

Pemeriksaan Kebuntingan

Pemeriksaan kebuntingan dilakukan menggunakan USG pada hari ke-30 setelah inseminasi. Keberhasilan IB dinilai dari angka konsepsi atau *conception rate* (CR) dengan melihat jumlah betina yang bunting dibagi jumlah betina yang diinseminasi dikali 100%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

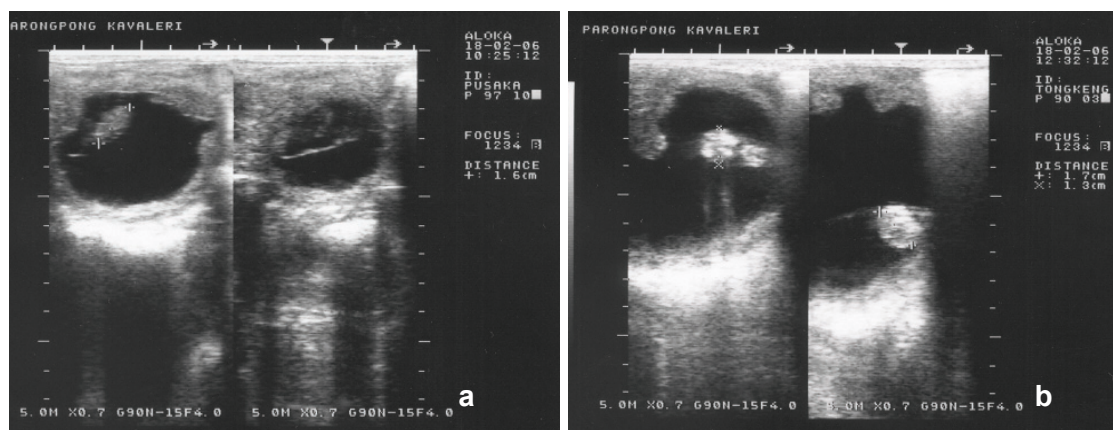
Respon terhadap Sinkronisasi Estrus dan Ovulasi

Sebanyak 14 ekor (73,7%) dari 19 ekor kuda yang diberi PGF₂α dua kali dengan selang waktu 14 hari menunjukkan gejala estrus. Monitoring perkembangan folikel pada kuda-kuda yang dinyatakan estrus dilakukan dengan menggunakan USG pada hari ketiga (pertengahan estrus). Hasilnya menunjukkan bahwa pada kuda-kuda tersebut memiliki folikel dominan yang berukuran 3,6±0,6 cm. Respon kuda betina terhadap sinkronisasi PGF₂α yang diberikan secara berulang menunjukkan respon individual yang sangat tinggi (Tabel 1).

Penyuntikan hCG 2500 IU pada hari ketiga estrus dilakukan dengan tujuan untuk induksi dan menyergamkan waktu ovulasi. Hasilnya menunjukkan bahwa 35 jam setelah pemberian hCG, sebanyak 5 dari 14 ekor (35,7%) telah mengalami ovulasi, sisanya sembilan ekor lagi menunjukkan pertambahan ukuran folikel sebesar 0,3±0,1 cm (Tabel 1). Secara alamiah ovulasi pada kuda terjadi pada 24 sampai 48 jam sebelum akhir estrus (Squires, 2004). Pemberian hCG dapat menginduksi terjadinya ovulasi lebih cepat. Menurut Squires (2004), ovulasi akan terjadi antara 36 dan 42 jam atau 36 dan 48 jam (Evans *et al.*, 2006) setelah penyuntikan hCG. Samper *et al.* (2002a) menambahkan 83,3% kuda akan ovulasi pada jam ke-48 dan 100% pada jam ke-96, jika penyuntikan dilakukan pada kuda yang mempunyai folikel dengan diameter lebih dari 30 mm. Morel & Newcombe (2008) melaporkan pemberian hCG 750 IU sama efektifnya dengan 1500 IU dan ovulasi terjadi antara 92,4% sampai dengan 92,5% pada jam ke-48.

Tabel 1. Respon kuda betina terhadap pemberian prostaglandin F₂α (PGF₂α) dan induksi ovulasi menggunakan human chorionic gonadotrophin (hCG)

Perlakuan	Jumlah kuda	(%)
Sinkronisasi estrus dengan PGF ₂ α		
berespons	14	73,7
tidak berespons	5	26,3
Letak folikel		
pada ovarium kiri	8	57,0
pada ovarium kanan	6	47,0
35 jam setelah penyuntikan hCG		
ovulasi	5	35,7
pertambahan ukuran folikel < 0,5 cm	6	42,9
pertambahan ukuran folikel > 0,5 cm	3	21,4



Gambar 1. Hasil ultrasonografi (USG) pemeriksaan kebuntingan a. kuda Pusaka umur 48 hari dan b. kuda Tongkeng umur 66 hari. + = jarak antara ujung kepala sampai pangkal ekor (Crown rump), kuda Pusaka= 1,6 cm, kuda Tongkeng= 1,7 cm.

Hasil yang berbeda diperoleh pada penelitian ini. Ovulasi terjadi lebih cepat, terbukti ada 35,7% kuda betina mengalami ovulasi pada jam ke-35 setelah penyuntikan hCG. Hal ini dapat dimengerti karena adanya perbedaan respon individu, kondisi lingkungan serta ukuran dan *breed* kuda yang digunakan. Ovulasi pada 9 ekor kuda lainnya pada penelitian ini tidak diobservasi lebih lanjut. Keberhasilan sinkronisasi estrus menggunakan PGF₂ α pada kuda hasil penelitian ini adalah 73,7% dengan penyuntikan ganda, angka ini hampir sama dengan laporan Hyland & Bristol (1979) yang melaporkan keberhasilan estrus sebesar 77,8%–92,0% menggunakan hormon yang sama.

Keberhasilan Inseminasi Buatan

Daya tahan hidup spermatozoa dari semen cair dan semen beku berbeda. Spermatozoa dari semen cair mempunyai daya tahan hidup yang lebih lama, sehingga inseminasi menggunakan semen cair dapat dilakukan 12 sampai 24 jam sebelum ovulasi. Mengingat daya tahan hidup spermatozoa dari semen beku pasca *thawing* yang rendah, maka inseminasi menggunakan semen beku harus dilakukan 6 jam sebelum ovulasi sampai dengan 6 jam sesudahnya (Squires *et al.*, 2003). Oleh karena itu penggunaan USG untuk melihat perkembangan folikel mutlak dibutuhkan. Inseminasi pada percobaan ini dilakukan pada jam ke-36 setelah penyuntikan hCG, dengan dosis inseminasi berkisar 200x10⁶ (semen cair) sampai 300x10⁶ TNSM (semen beku). Pemeriksaan kebuntingan (PKB) menggunakan USG (Gambar 1) setelah satu bulan pelaksanaan inseminasi menunjukkan 3 dari 7 ekor bunting menggunakan semen cair dan hanya 1 dari 7 ekor bunting menggunakan semen beku, sehingga angka konsepsi (conception rate=CR) masing-masing adalah 42,9% dengan semen cair dan 14,3% dengan semen beku (Tabel 2).

Angka konsepsi yang dihasilkan dalam penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan laporan Backman *et al.* (2004), yaitu bahwa IB menggunakan semen cair menghasilkan CR 70% dan semen beku 53%. Darenius (2000) membandingkan keberhasilan antara kawin alam,

IB dengan semen segar, semen cair, dan semen beku menggunakan 1206 kuda betina dari jenis standarbred trotter, swedish warm blood, dan thoroughbred. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa CR yang hampir sama antara kawin alam (59,9%), IB semen segar (61,6%) dan IB semen cair (63,7%), kecuali menggunakan semen beku menunjukkan CR yang paling rendah, yaitu 43,5%. Müller & Müller (2000) melaporkan CR yang hampir sama dengan penelitian ini, yaitu hanya 44% untuk semen cair, tetapi menunjukkan CR yang lebih tinggi untuk semen beku yaitu 36%.

Rendahnya CR hasil inseminasi dengan semen beku pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, pertama terlambatnya waktu inseminasi, kedua kemungkinan kurangnya jumlah spermatozoa motil yang diinseminasikan. Menurut Katila (2005), saat ini konsentrasi spermatozoa yang digunakan untuk IB pada kuda antara 5 sampai dengan 500x10⁶. Semen beku yang digunakan pada percobaan ini mempunyai PTM antara 35%-40% dengan jumlah total spermatozoa motil dari semen beku yang diinseminasikan sebanyak 250 sampai dengan 300x10⁶. Menurut Vidament *et al.* (2002), jumlah sel motil untuk IB menggunakan semen beku antara 150 sampai dengan 300x10⁶, bahkan Woods *et al.* (2000), Morris *et al.* (2003) dan Siemme *et al.* (2004) melaporkan angka kebuntingan yang cukup tinggi dengan konsentrasi spermatozoa <50 x10⁶, tetapi dalam penelitian ini meskipun dengan jumlah sel yang cukup tinggi, fertilisasi tidak terjadi.

Post thawing motility semen beku yang digunakan dalam penelitian ini adalah 35%-40%. Menurut Kuisma *et al.* (2006), nilai tersebut cukup tinggi, mengingat PTM

Tabel 2. Angka konsepsi hasil inseminasi buatan (IB) menggunakan semen cair dan semen beku pada kuda

Jenis semen	Jumlah kuda yang di IB (n)	Jumlah kuda yang bunting	Angka konsepsi (%)
Cair	7	3	42,9
Beku	7	1	14,3

pada semen beku kuda yang diizinkan untuk dijual adalah >30%. Namun demikian peneliti tersebut juga menyebutkan sulitnya memprediksi fertilitas semen beku hanya dari hasil PTM laboratorium.

Angka konsepsi yang diperoleh dalam penelitian ini cukup tinggi untuk inseminasi menggunakan semen cair, hal ini karena daya tahan hidup spermatozoa dari semen cair lebih baik dibandingkan dengan semen beku, sehingga kemungkinan terjadi fertilisasi lebih tinggi. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB menurut Sieme *et al.* (2000) adalah fertilitas kuda jantan dan manajemen, teknik preservasi semen, pelaksana IB (inseminator) serta kuda betina yang digunakan. Faktor teknik yang dimaksud diantaranya adalah pengencer, rasio pengenceran, *cooling rate*, kondisi penyimpanan, volume inseminasi, dan dosis inseminasi yang digunakan. Faktor betina, selain dipengaruhi kesehatan reproduksi, umur kuda yang digunakan juga sangat penting. Samper *et al.* (2002b) menambahkan beberapa faktor yang mempengaruhi angka kebuntingan pada kuda dengan semen beku, yaitu teknis IB, umur kuda betina dan status kesehatannya, volume dan waktu IB dan jumlah spermatozoa perinseminasi.

Umur kuda betina yang layak untuk pengujian fertilitas adalah antara 5 dan 12 tahun. Loomis (2004) melakukan inseminasi pada kuda betina dengan berbagai kisaran umur, mulai dari 3-6; 7-11, 12-16, dan lebih dari 16 tahun. Hasilnya menunjukkan bahwa CR hasil inseminasi menggunakan semen beku pada kuda-kuda yang berumur 3 sampai dengan 16 tahun dapat mencapai 53,7% sampai dengan 57,9%, sedangkan setelah 16 tahun CR menurun menjadi hanya 48,4%.

Kuda betina yang berada dalam kisaran umur yang layak digunakan untuk uji fertilitas dalam penelitian ini hanya 7 ekor (36,8%), sisanya berumur antara 15 dan 23 tahun. Jika mengingat kuda-kuda yang digunakan sangat bervariasi dalam perbedaan umur, jumlah beranak dan kondisi tubuh secara umum, maka angka kebuntingan menggunakan semen cair cukup tinggi. Angka kebuntingan 14,3% untuk semen beku pada penelitian ini cukup rendah dibandingkan dengan laporan peneliti sebelumnya, tetapi hal ini dapat dipahami mengingat kuda-kuda betina yang digunakan tidak dalam kisaran umur yang optimal dan daya tahan spermatozoa dari semen beku sangat rendah.

KESIMPULAN

Inseminasi buatan menggunakan semen cair pada kuda menghasilkan angka konsepsi yang lebih tinggi sebesar 42,9% (3/7) dibandingkan dengan menggunakan semen beku, 14,3% (1/7).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada pimpinan dan Staf Kavaleri Angkatan Darat, Parongpong-Lembang, Bandung, yang telah banyak membantu dan memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifiantini, R. I., T. L. Yusuf, & B. Purwantara. 2006. Daya tahan spermatozoa kuda hasil sentrifugasi dengan kadar plasma semen yang berbeda menggunakan pengencer skim. JAP 8:160-167.
- Arifiantini, R. I., I. Supriatna, & Aminah. 2007. Kualitas semen beku kuda dalam pengecer susu skim dan dimitropoulos dengan dimetilformamida sebagai krioprotektan. Med. Pet. 30:100-105.
- Backman, T., J. E. Bruemmer, J. K. Graham, & E. L. Squires. 2004. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. J. Anim. Sci. 82:690-694.
- Darenius, K. 2000. Fertility data in the horse. Proceedings of the First Meeting of the European Equine Gamete Group (EEGG) 5th-8th September 1999. R & W Publications, Lopuszna.
- Evans, M. J., E. L. Gastal, L. A. Silva, M. O. Gastal, N. E. Kitson, S. L. Alexander & C. H. G. Irvine. 2006. Plasma LH concentrations after administration of human chorionic gonadotrophin to oestrous mares. Anim. Reprod. Sci. 94:191-194.
- Hyland, J. H. & F. Bristol. 1979. Synchronization of estrus and timed insemination of mare. J. Reprod. Fert. Supp. 27:251-255.
- Katila, T. 2005. The effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. Anim. Reprod. Sci. 89:31-38.
- Kuisma, P., M. Andersson, E. Koskinen, & T. Katila. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by then currently used laboratory methods Acta Vet. Scand. 48:14.
- Linfor, J. J., A. C. Pommer, & S. A. Meyers. 2002. Osmotic stress induces tyrosine phosphorylation of equine sperm. Theriogenology 58:355-358.
- Loomis, P. R. 2004. Clinical fertility data for mares inseminated with frozen semen: effects of timing and frequency of insemination. Proceedings of a Workshop on Transporting Gametes and Embryos 2nd-5th October 2003 Brewster. R & W Publications, Massachusetts.
- Morel, D. M. C. G. & J. R. Newcombe. 2008. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. Anim. Reprod. Sci. 109:189-199.
- Morris, L. H. A., C. Tiplady, & W. R. Allen. 2003. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. Equine Vet. J. 35:197-201.
- Müller, Z & J. Müller. 2000. Pregnancy rates following insemination with fresh versus frozen semen. Proceedings of The First Meeting of the European Equine Gamete Group (EEGG). 5th-8th September 1999. R & W Publications, Lopuszna.
- Nie, G. J., J. G. W. Wenzel, & K. E. Johnson. 2002. Comparison of pregnancy outcome in mares among methods used to evaluate and select spermatozoa for insemination. Anim. Reprod. Sci. 69:211-222.
- Samper, J. C. 2001. Management and fertility of mares bred with frozen semen. Anim. Reprod. Sci. 68: 219-228.
- Samper, J. C., S. Jensen, J. Sergeant, & A. Estrada. 2002a. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. J. Equine Vet. Sci. 22:320-323.
- Samper, J. C., M. Vidament, T. Katila, J. Newcombe, A. Estrada, & J. Sergeant. 2002b. Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-center study. Theriogenology 58:647-650.

- Sieme, H., E. Klug, & E. Töpfer-Petersen.** 2000. Large scale commercial application of fresh, cooled and deep frozen stallion semen. Proceedings of the First Meeting of the European Equine Gamete Group (EEGG) 5th–8th September 1999. R & W Publications, Lopuszna.
- Sieme, H., A. Bonk, H. Hamann, E. Klug, & T. Katila.** 2004. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology* 62:915–928.
- Squires, E. L., S. Barbacini, D. Necchi, H. P. Reger, & J. E. Bruemmer.** 2003. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. 49th Annual Convention of the American Association of Equine. Veterinary Information Service (www.ivis.org).
- Squires, E. L.** 2004. Management of Mares for Insemination with Frozen Semen. www.selectbreeders.com/KnowledgeDocs/SBSMareMgtforWeb.pdf [14 September 2004].
- Vidament, M., A. M. Dupere, P. Julienne, A. Avain, P. Nopue, & E. Parmer.** 2002. Equine frozen semen: freezability and fertility field result. *Theriogenology* 48:907–917.
- Woods, J., S. Rigby, S. Brinsko, R. Stephens, D. Varner, & T. Blanchard.** 2000. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E2 prior to insemination of mares in the uterine horn or body. *Theriogenology* 53:1827–1836.